动 物 学 研 究 2007，Dec. 28(6)：580－588 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

# 短额负蝗线粒体基因组及其 lrRNA 和 srRNA 二级结构分析

丁方美，师红雯，黄 原*
（陕西师范大学 生命科学学院，陕西 西安 710062）

**摘要**：采用长距 PCR 扩增及保守引物步移法测定并注释了短额负蝗的线粒体基因组全序列。结果表明，短额负蝗的线粒体基因组全长 15 558 bp，A+T 含量为 74.3%，37 个基因位置与飞蝗的一致，基因间隔序列共计 11 处 64 bp，间隔长度从 1～16 bp 不等；有 15 对基因间存在 51 bp 重叠，重叠碱基数在 1～8 bp 之间。13 个蛋白质编码基因中找到 6 种可能的起始密码子，有 12 个基因在基因 3′ 端能找到完全的 TAA 或 TAG 终止密码子，只有 ND5 基因终止密码子为不完整的 TA。除 tRNA$^{Ser}$（AGN）外，其余 21 个 tRNA 基因的二级结构均属典型的三叶草结构。tRNA$^{Ser}$（AGN）的 DHU 臂缺失，在相应的位置上只形成一个环。预测的 lrRNA 二级结构总共有 6 个结构域（结构域Ⅲ缺失），49 个茎环结构。预测的 srRNA 的二级结构包含 3 个结构域，33 个茎环结构。A+T 丰富区中存在一个被认为与复制及转录起始有关的 Ploy（T）（T-stretch）结构。

**关键词**：线粒体基因组；rRNA 二级结构；短额负蝗；锥头蝗科；直翅目
**中图分类号**：Q969.26；Q754 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2007)06-0580-09

# Complete Mitochondrial Genome and Secondary Structures of lrRNA and srRNA of *Atractomorpha sinensis* (Orthoptera, Pyrgomorphidae)

DING Fang-mei, SHI Hong-wen, HUANG Yuan
(*College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China*)

**Abstract:** The complete sequence of *Atractomorpha sinensis* mitochondrial genome was determined using long PCR and conserved primer walking approaches. The results showed that the entire mitochondrial genome of *A. sinensis* is 15558 bp long with A+T content 74.3%. All 37 genes are conserved in the position observed in that of *Locusta migratoria*. Genes are closely assembled one after the other, leaving a total of 64 bp (excluding the A+T rich region) in intergenic spacers, ranging in size from 1 bp to 16 bp. The extremities of some genes overlap with each other by a few nucleotides, of which 15 overlaps range in size from 1 bp to 8 bp, giving a total of 51 overlapping nucleotides. In the 13 protein coding genes (PCGs), six types of start codons were identified, in which TAA and TAG were used in 12 PCGs as stop codons, except ND5 (TA). Most tRNA genes could form typical secondary structures except tRNA$^{Ser}$ (AGN), which had an absence of the DHU arm. There are six domains, 49 helices and three domains, 33 helices in the secondary structures of lrRNA and srRNA, respectively. In addition, there is an A+T rich region with 778 bp in length containing a polythymidine stretch that may be involved in replication and/or translation initiation.

**Key words:** Mitochondrial genome; rRNA secondary structure; *Atractomorpha sinensis*; Pyrgomorphidae; Orthoptera

后生动物线粒体基因组（mitochondrial genome, mtDNA）通常是编码 37 个基因（13 个蛋白质基因、22 个 tRNA 基因及 2 个 rRNA 基因）和一个控制区（control region；也称 A+T 丰富区，A+T rich region）的细胞器基因组（Wolstenholme, 1992; Shadel & Clayton, 1993）。目前 mtDNA 已被广泛用于系统发育重建、谱系生物地理学、群体结构及动态和基因组水平分子进化等领域的研究 (Simon et al, 1994, 2006)。截至 2007 年 8 月，GenBank 已公布了 1000 多种后生动物的 mtDNA，但其中大部分是脊椎动

收稿日期：2007-10-08； 接受日期：2007-11-08
基金项目：国家自然科学基金（30470238）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail：yuanh@snnu.edu.cn
第一作者简介：丁方美，女，硕士研究生，研究方向：昆虫分子进化。

物，昆虫纲有分布于 18 个目的 70 多条全序列，其中双翅目 19 种，半翅目 11 种，鳞翅目 7 种，而直翅目仅有 3 种：非洲飞蝗 *Locusta migratoria*（Flook et al, 1995）、东方蝼蛄 *Gryllotalpa orientalis*（Kim et al, 2005）和螽斯 *Ruspolia dubia*（Zhou et al, 2007）（http://www.ncbi.nlm. nih.gov/ genomes）。

作为分子标记，全线粒体基因组包含多个进化速率各异的基因，因此理论上可用来分析不同阶元的系统发育关系。目前，在节肢动物的系统发育分析中，线粒体基因组序列已在门级分类群（Nardi et al, 2003; Cameron et al, 2004；Kim et al, 2005）、纲级分类群（昆虫）乃至同种的不同品系，如果蝇（Ballard, 2000）等各个阶层中得到应用。这些结果很好地支持了双翅目、鳞翅目、鞘翅目和半翅目的单系性（Kim et al, 2005）。但由于线粒体基因组测序在昆虫各个分类单元中的进展有所不同，对像直翅目等已测序较少的类群，由于所选物种的特殊进化模式及建树时的长枝吸引等问题而可能产生不恰当的结论。因此，增加这些类群中有关物种的全序列数据有利于更好地解决它们的系统发育关系。

短额负蝗 (*Atractomorpha sinensis*)是直翅目蝗总科锥头蝗科的广布种和最常见种，在蝗总科的系统发育研究中有独特位置。本文测定并分析了短额负蝗线粒体基因组全序列，并据此对其编码的大、小亚基 rRNA 的二级结构做了预测和分析。短额负蝗的线粒体基因组将为直翅目昆虫的线粒体谱系基因组学研究提供新的数据资料。

## 1　材料和方法

### 1.1　标本采集及总 DNA 的提取

短额负蝗标本于 2006 年 9 月在陕西省长安县采集。直接用酚－氯仿抽提法从新鲜标本的后足股节肌肉提取总 DNA，标本的其他部分用 100%酒精固定保存；提取的总 DNA 保存于−20℃。

### 1.2　PCR 扩增、克隆及测序

首先，通过2对长距PCR（L-PCR）引物将短额负蝗线粒体基因组扩增为两条相互重叠的片段（片段A和B）（Liu et al，2006），然后用27对保守的引物以片段A和B为模板将整个基因组扩增为500～1500bp的短片段（所用引物见表1，27条片段的位置见图1）。短片段的扩增体系总体积为25μL，包括10×反应缓冲液2.5μL，25mmol/L $MgCl_2$ 2.5μL, 2.5mmol/L dNTP 2μL, 10μmol/L上、下游引物各1.5～5μL，5U/μL TaqDNA 聚合酶0.15～0.35μL和长片段产物（作为DNA模板）1～2μL，然后加$ddH_2O$至终体积25μL。反应程序为: 94℃×2min＋（94℃×30s＋38～55℃×30s＋72℃×1min）×30 cycles＋72℃×7min＋4℃ forever。

27条PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳检测，切胶纯化后直接测序，对于直接测序结果不好的片段再采用克隆测序。测序试剂盒为ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1，直接测序反应的退火温度较相应PCR扩增退火温度降低2～6℃，克隆测序反应的退火温度为50℃。测序反应程序为：96℃×1min＋（96℃×10s＋38～55℃×1min＋60℃×4min）×30 cycles＋4℃ forever。测序反应产物经纯化后在ABI PRISM™ 3100-Avant Genetic Analyzer测序。

### 1.3　序列拼接、注释及分析

用Standen package（Bonfield et al, 1995; http://standen.sourceforge.net）对所测序列进行拼接和注释。拼接好的基因组序列首先利用tRNAscan-SE Search Server v1.21（Lowe and Eddy, 1997; http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE）共预测出17个tRNA基因，其余的tRNA基因、蛋白质基因、rRNA基因及A+T丰富区的相应位置通过与非洲飞蝗（NC_001712）的相应基因序列比对来确定。确定每个基因的位置及序列后，利用Clustal X（Thompson et al, 1997）及MEGA 3.0（Kumar et al, 2004）等软件对序列信息进行分析。另外，以螽斯

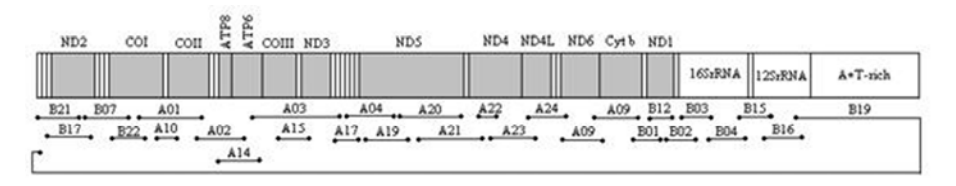



图 1　短 PCR 扩增及测序策略

Fig. 1　Strategy for sub-PCR and sequencing of *Atractomorpha sinensis*

表 1 PCR扩增及直接测序引物

**Tab. 1 Primers used in the amplification and direct sequencing**

| 上游引物 Forward primer | 引物序列 Sequence（5′—3′） | 下游引物 Reverse primer | 引物序列 Sequence (5′－3′) |
|---|---|---|---|
| LPA03 | CATTTATTTTGATTYTTTGGWCAYCCAGAAGT | LPA06 | TGATTAGCTCCACAAATTTCTGAACATTGACC |
| F16 | TTTATTCAATGATAYCCWYT | R16 | ATCTAAGWGMATAWCCTACA |
| F03 | ATTGAYGCAACACCMGGACG | R04 | TAGGGTCCCTGGCCGAATWA |
| F18 | AATWCCTCAAATAKYACC | R30 | TATGCTTGAATTATWGCTAC |
| F04 | AATGTTATTCGGCCWGGRAC | R05 | CAGTAATACGCCTCTYTTTG |
| F19 | TTATTTATTRYWTCAGAART | R20 | TCAACAAARTGTCARTATCA |
| F21 | GAATGAAATCAAGGAGYWYT | R21 | TTGATYWTGGTTGARKWGA |
| F05 | AGAGAGGCGTATTACTGTTA | R06 | TTTRAAGGATTCTCAGGATA |
| F23 | TCACCTCAACCAWAATCAA | R07 | GCACCTACTCCWGTTTCTYC |
| F24 | CCAGCAGTAACWARAGTRGA | R23 | GCTTATTCTTCWGTWKYTCA |
| F07 | ATTAATAATCTACGRCTWYS | R24 | ATTTTKGGKTGAGGKTAYCA |
| F26 | GGAGCTTCAACATGAGCYTT | R25 | TTAAYTTTTTBWRTTTGTGA |
| F27 | TAAACWWAWAGGGATYAA | R26 | GATGCAATTCTTGYWAYRTA |
| F28 | CATTCCTAGGAGGYATAHTA | R27 | CCATAATAWATWCCTCGTC |
| F08 | AGTACACATTTGCCGAGACG | LPA04 | AAAATWGCRTAWGCAAATARAAAATATCATTC |
| LPA05 | WACACCAGTTCATATTCAACCAGAATGATATT | R11 | GAAACTAATCGWACWCCWT |
| F33 | TTATCATAWCGAAAWCGWGG | R32 | TGCTCAAACWATTTCTTATG |
| F10 | GGAGTTCGRTTWGTTTCWGC | R12 | GATTGCGACCTCGATGTTGG |
| F11 | GCTCACGCCGGTYTGAACTC | R15 | CGCCTGTTTAACAAAAACAT |
| F12 | TTGCACAGTCAWAATACC | R13 | TACACATCGCCCGTCRCTCT |
| F29 | TTTAWTTTADAGCTTATCCC | R14 | CGGTATTTYATTCCATTCAGAG |
| F30 | CTGATAACGRCGRTATAYAA | R28 | AAAGTTTKATTCTKGCTTA |
| F13 | GCGGCTGCTGGCACGAAA | R31 | GGGGTATGAACCCAWTAGC |
| F32 | TAAAGGRTTAYYTTGATAG | R01 | AATCCTAGAAATGGTGGYAR |
| N2-J | AATYAAGCTAWTRGGTTCAT | N2-N | ATAGGCGWTARAYTGTAAAT |
| F01 | GGACTACCACCATTWHTWGG | R02 | GGGTCAAAGAATGAWGTATT |
| F31 | GGAGGATTYGGAAATTGATTAGT | R29 | TACTGTAAATATATGRTGDGCTC |

LPA03、LP04和LP05、LP06分别也是长片段A、B的引物 (LPA03、LP04 and LP05、LP06 are the primer pairs utilized in long-PCR)。

*Ruspolia dubia*（Zhou et al, 2007）和蜜蜂 *Apis mellifera*（Gillespie et al, 2006）的 lrRNA 和 srRNA 二级结构为基础对短额负蝗相应 rRNA 的二级结构进行了预测。

短额负蝗线粒体基因组序列已提交到 GenBank，序列号为：EU263919。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组结构

本研究共测得 114 条可用序列，拼接后一致序列的总长度为 15680 bp，序列覆盖率 4.24 倍，除去两端重叠序列得到短额负蝗整个线粒体基因组的总长度为 15558 bp。

通过与非洲飞蝗全线粒体基因组的比较，确定短额负蝗线粒体基因组编码 13 个蛋白质基因、2 个 rRNA 基因、22 个 tRNA 基因及一个 A+T 丰富区，A+T rich region)。基因排列顺序与非洲飞蝗一致；基因间排列也非常紧凑，除 A+T 丰富区外只有 64 bp 的基因间隔，共计 11 处，间隔长度从 1～16 bp 不等；另外，有 15 对基因间存在碱基重叠，重叠碱基数在 1～8 bp 之间，共计 51 bp。短额负蝗线粒体基因组结构如图 2 所示。

### 2.2 碱基组成及密码子使用

短额负蝗线粒体基因组序列不同区域核苷酸组成情况见表 2。全序列的 A+T 含量为 74.3%，778 bp 的 A+T 丰富区（81.4%）、3713 bp 的蛋白质基因

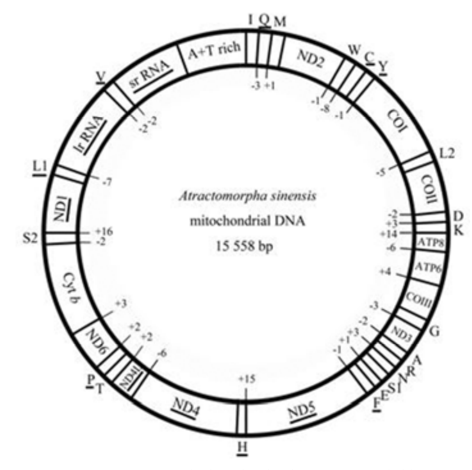



图 2　短额负蝗线粒体基因组结构

Fig. 2　The structure of complete mitochondrial genome of *Atractomorpha sinensis*

加下划线的基因在 N 链上编码；tRNA 基因用氨基酸的单字母表示，L1、L2 和 S1、S2 分别表示 $tRNA^{Leu(CUN)}$、$tRNA^{Leu(UUR)}$ 和 $tRNA^{Ser(AGN)}$、$tRNA^{Ser(UCN)}$；两基因间的数字表示该基因对之间的间隔（+）及重叠（-）。Those genes encoded by the N strand are underlined. The tRNA genes are designated by single letter amino acid codes; L1, L2 and S1, S2 denote the $tRNA^{Leu(CUN)}$, $tRNA^{Leu(UUR)}$ and $tRNA^{Ser(AGN)}$, $tRNA^{Ser(UCN)}$. Numbers inside the circle represent the size of the fragments separating two adjacent genes (+) or the amount of shared nucleotides between two overlapping genes (-).

第 3 位点（85.0%）及 64 bp 基因间隔区（84.4%）属于高 A+T 丰富区，而密码子第 1、2 位点的 A+T 含量均低于全序列平均水平。

利用 MEGA3.0 对短额负蝗的 13 个蛋白质编码基因的相对同义密码子使用频率（relative synonymous codon usage，RSCU）进行了统计（表 3）。从表中我们可以看出，对于有两个同义密码子的氨基酸，第 3 位点为 A 和 U 的密码子使用频率较高；对于有 4 个同义密码子的氨基酸来说，J 链编码基因偏向于使用第 3 位点为 A 的密码子，而 N 链偏向于使用第 3 位点为 U 的密码子。

**2.3　蛋白质编码基因**

在短额负蝗的 13 个蛋白质编码基因中找到 6 种可能的起始密码子，COⅡ、ATP6、COⅢ、ND4、ND4L、ND6 和 Cyt *b* 7 个蛋白质基因中使用 ATG 作为起始密码子；ND1 和 ND5 以 ATT 作为起始密码子；ATP8、ND3 和 ND2 基因分别以 ATC、ATA、GTG 作为起始密码子；COⅠ的起始密码子比较特殊，为 CCG。

13 个蛋白质基因中有 12 个基因在基因 3′端能找到完全的 TAA 或 TAG 终止密码子，只有 ND5 基因没能找到完整的终止密码子，通过与飞蝗 ND5 基因的比对确定 ND5 基因位置无误，因此我们认为 ND5 基因的终止密码子为不完整的 TA 终止密码子。

**2.4　转运 RNA（tRNA）基因**

通过 tRNAScan-SE 软件预测及与飞蝗线粒体基因组序列的比较确定了 22 个 tRNA 基因的位置（图 2）及二级结构（图 3）。除 $tRNA^{Ser}$（AGN）外，其余 21 个 tRNA 基因的二级结均属典型的三叶草结构。$tRNA^{Ser}$（AGN）的 DHU 臂缺失，在相应的位置上只形成一个环。

**2.5　核糖 RNA（rRNA）基因**

短额负蝗线粒体基因组的两个 rRNA 基因（lrRNA 和 srRNA）分别位于 $tRNA^{Leu(L\text{-}CUN)}$和 $tRNA^{Val (V)}$、$tRNA^{Val (V)}$和 D-loop 之间（图 2）。两个 rRNA 基因的 A+T 含量为 75.7%，高于整个基因组的平均 A+T 含量（74.3%），G 含量（15.5%）几乎是 C 含量（8.8%）的两倍。

以螽斯（Zhou et al, 2007）和蜜蜂（Gillespie et al, 2006）的 lrRNA 和 srRNA 二级结构为基础对短额负蝗的二级结构进行了预测。短额负蝗 lrRNA 二级结构总共有 6 个结构域（结构域Ⅲ缺失），49 个茎环结构（图 4A）。srRNA 的二级结构包含 3 个结构域，33 个茎环结构。短额负蝗 lrRNA 和 srRNA 二级结构整体与螽斯和蜜蜂基本相似，只在少数位置存在差异。

**2.6　A+T 丰富区**

短额负蝗的 A+T 丰富区位于 srRNA 与 $tRNA^{Ile(I)}$之间（图 2），全长 778 bp，A+T 含量为 81.4%，明显高于整个基因组的平均水平。在短额负蝗的 A+T 丰富区发现一段 Poly（T）（*T stretch*），且能形成一个茎环结构（图 5）。

## 3　讨　论

### 3.1　正反链不同的密码子使用偏好

在分析短额负蝗线粒体基因组两条链上编码的蛋白质密码子使用情况时发现正反链密码子的使用存在差异，即 J 链编码基因偏向于使用第 3 位点为 A 的密码子，而 N 链偏向于使用第 3 位点为 U 的密码子（主要分析有四个同义密码子的氨基酸）。这种核苷酸组成的不对称在哺乳动物 mtDNA 中也存在（Reyes et al, 1998; Saccone et al, 1999）。Francino & Ochman（1997）推测在哺乳动物中 N

表 2 短额负蝗线粒体基因组不同功能部位的碱基组成

**Tab. 2 The base composition of different functional sites of the mitochondrial genome of *Atractomorpha sinensis***

| 基因组不同功能部位 Annotated genome feature | 碱基数目 Number of nucleotides | A | T | C | G | A+T |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Whole genome (J strand) | 15558 | 0.431 | 0.312 | 0.150 | 0.107 | 0.743 |
| All protein genes | 11139 | 0.317 | 0.419 | 0.132 | 0.133 | 0.736 |
| 1st codon position | 3713 | 0.338 | 0.356 | 0.118 | 0.188 | 0.694 |
| 2nd codon position | | 0.197 | 0.465 | 0.193 | 0.145 | 0.662 |
| 3rd codon position | | 0.415 | 0.435 | 0.084 | 0.066 | 0.850 |
| J strand protein genes | 6858 | 0.372 | 0.353 | 0.155 | 0.119 | 0.725 |
| 1st codon position | 2286 | 0.388 | 0.290 | 0.136 | 0.185 | 0.678 |
| 2nd codon position | | 0.210 | 0.440 | 0.217 | 0.133 | 0.650 |
| 3rd codon position | | 0.518 | 0.330 | 0.112 | 0.039 | 0.848 |
| N-strand protein genes | 4281 | 0.228 | 0.523 | 0.094 | 0.155 | 0.751 |
| 1st codon position | 1427 | 0.256 | 0.463 | 0.088 | 0.193 | 0.719 |
| 2nd codon position | | 0.177 | 0.504 | 0.156 | 0.164 | 0.681 |
| 3rd codon position | | 0.250 | 0.603 | 0.039 | 0.108 | 0.853 |
| All tRNA genes | 1462 | 0.376 | 0.360 | 0.115 | 0.149 | 0.736 |
| tRNA genes-J | 925 | 0.406 | 0.343 | 0.121 | 0.130 | 0.749 |
| tRNA genes-N | 538 | 0.325 | 0.388 | 0.104 | 0.182 | 0.713 |
| rRNA genes-N | 2130 | 0.300 | 0.457 | 0.088 | 0.155 | 0.757 |
| A+T rich region (J strand) | 778 | 0.423 | 0.391 | 0.100 | 0.086 | 0.814 |
| Non-coding nucleotides | 64 | 0.500 | 0.344 | 0.109 | 0.047 | 0.844 |

链因复制滞后而使核苷酸被暴露的时间较多，使得C脱去氨基变为U的几率增加，从而导致N链上的T偏向性。通过电镜及限制性图谱技术研究果蝇线粒体基因组的复制模式表明复制是极度不对称的即当J链复制完成99%以上时，N链才开始复制（Goddard & Wolstenholme, 1980）。这样的复制模式使得N链上积累了更多的碱基替换，因而呈现极度的碱基偏向性（Reyes et al, 1998）。

### 3.2 COⅠ起始密码子

根据飞洲飞蝗及其它昆虫的COⅠ序列确定了短额负蝗COⅠ的准确位置，推测COⅠ基因起始密码子为CCG。很多研究表明节肢动物的起始密码子比较特殊，除典型的三联体密码子外还推测了四联体（ATAA、TTAA、ATTA）（Wilson et al, 2000）和六联体（ATTTAA）（Beard et al, 1993）等作为起始密码子，直翅目的非洲飞蝗中也推测以ATTA作为起始密码子（Flook et al, 1995），但这种推测目前还未得到实验证明。也有学者在有些物种中将非典型的三联体密码子作为起始密码子，Krzywinski et al（2003）根据按蚊（*Anopheles funestus*）cDNA序列确定COI转录本5′端以TCG作为起始密码子，因此在这里我们推测CCG作为COⅠ的起始密码子，事实是否如此还有待实验的进一步证明。

### 3.3 rRNA 二级结构

预测的短额负蝗的lrRNA二级结构与螽斯(Zhou et al, 2007)和蜜蜂（Gillespie et al, 2006）相比有3处存在差异（a-c）（图4）：a位于结构域Ⅰ，b位于结构域Ⅱ，c位于结构域Ⅳ。a和b两处较螽斯和蜜蜂lrRNA中相应位置额外多出5个茎环结构（H-1、H-2、H-3、H-4和H20）；c处在短额负蝗

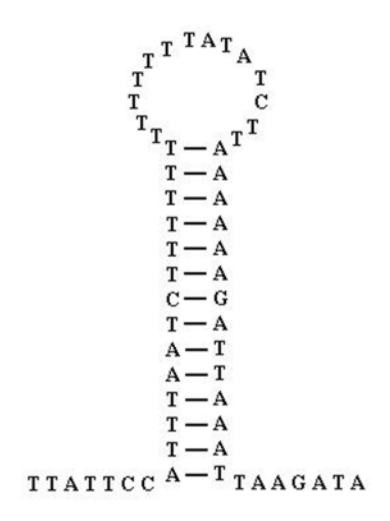


图 5 A+T丰富区Poly（T）及附近序列所形成的茎环结构

Fig. 5 Stem-loop structure found at the T stretch in the A+T rich region of *Atractomorpha sinensis*

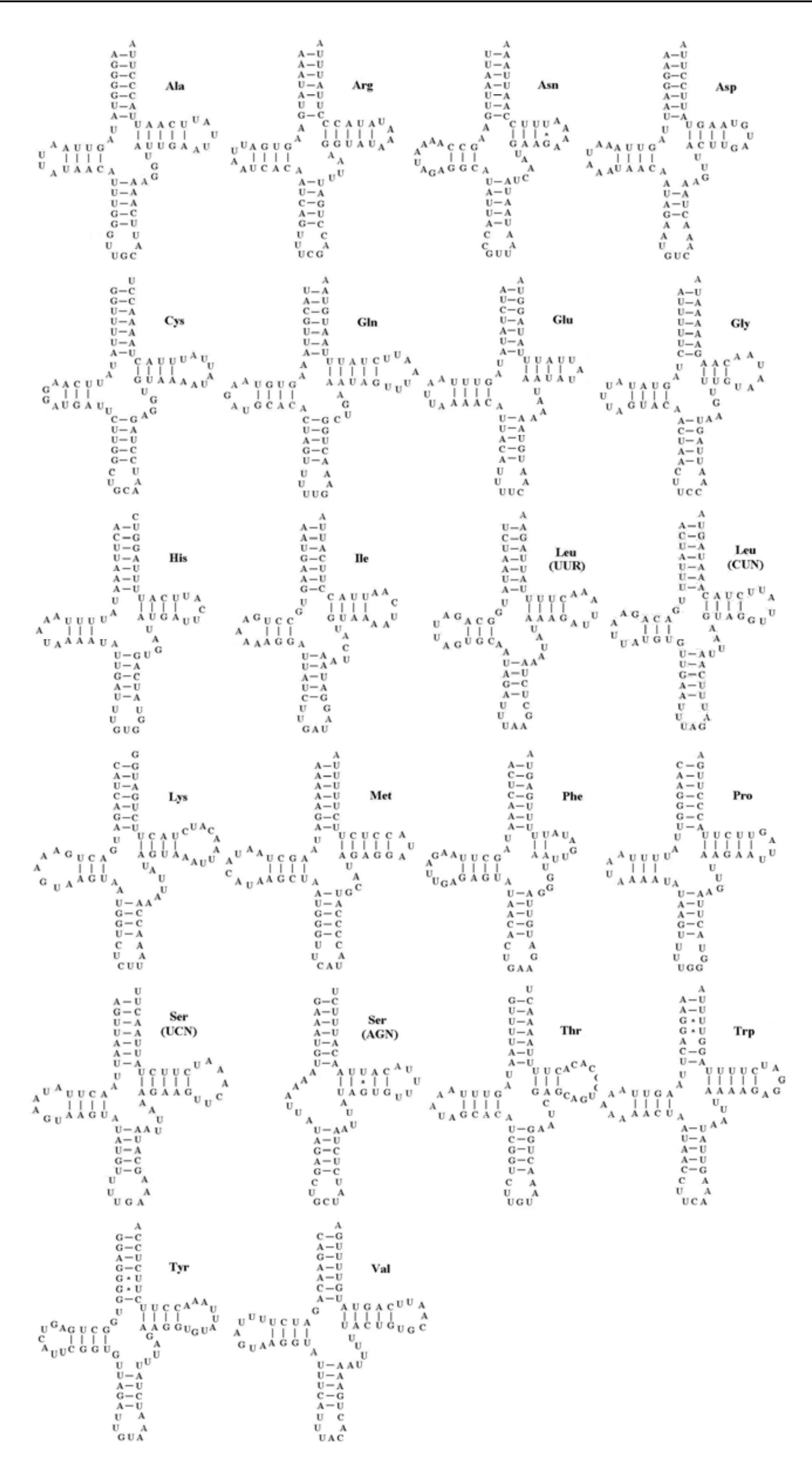



图 3　短额负蝗 22 个 tRNA 基因二级结构预测

Fig. 3　Inferred secondary structure of 22 tRNAs of *Atractomorpha sinensis*

tRNA 基因用相应的氨基酸缩写命名。直线表示标准的 AT、CG 配对，*表示 GU 配对。

The tRNAs are labeled with the abbreviations of their corresponding amino acids. Dashes indicating Watson-Crick base pairing and centered asterisks (*) indicating GU base pairing.

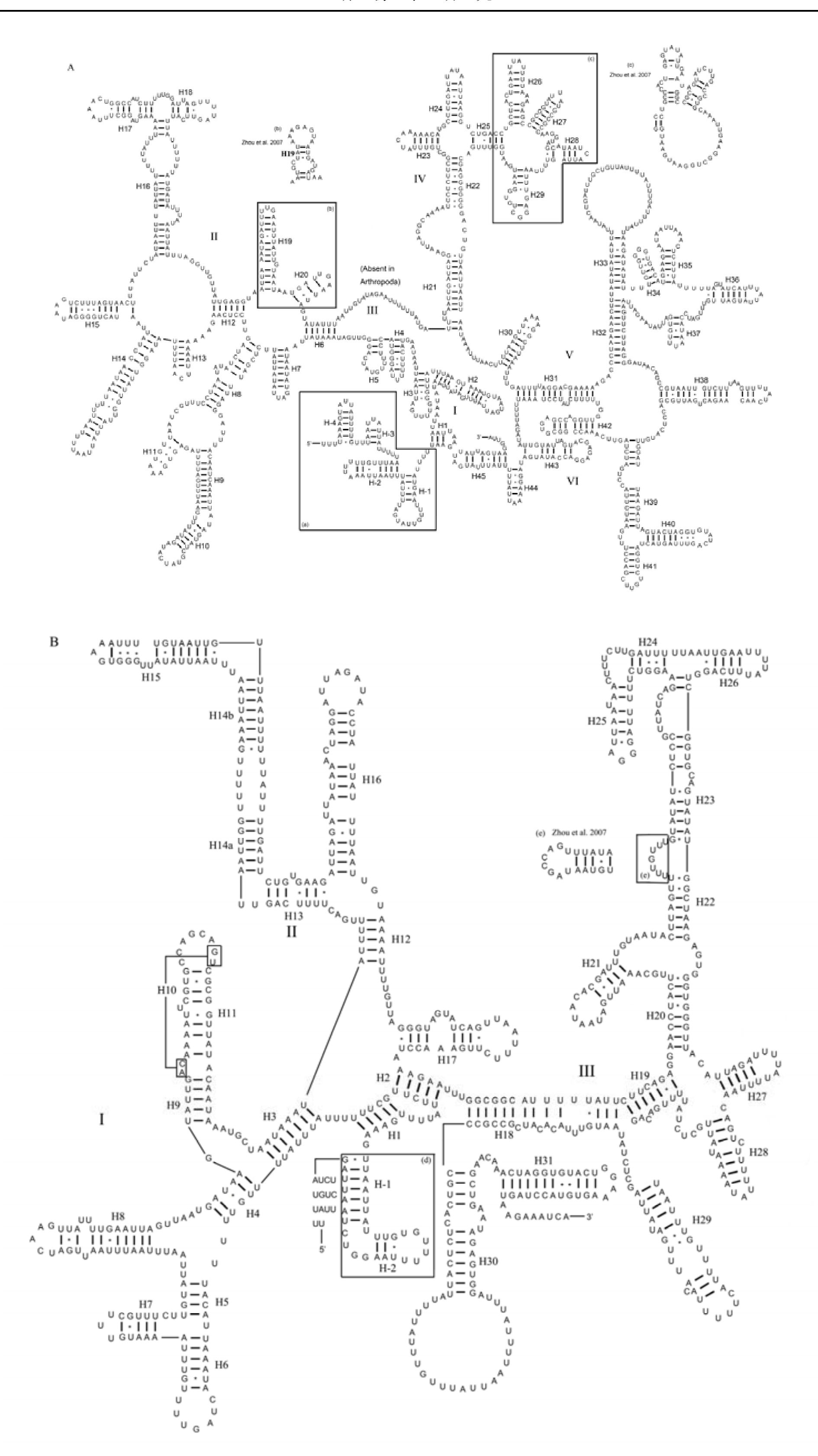



图 4 短额负蝗 rRNA（lrRNA 和 srRNA）二级结构预测结果

Fig. 4 The secondary structure of rRNA （lrRNA and srRNA）of *Atractomorpha sinensis*

A：lrRNA；B：srRNA。画框部分表示短额负蝗与螽斯之间存在差异的地方。

A：lrRNA; B：srRNA. The differences between our structure and previously published *Ruspolia dubia* structure (Zhou et al, 2007) are within boxes.

**表 3 短额负蝗线粒体基因组蛋白质基因同义密码子使用情况**

**Tab. 3 The codon usage of *Atractomorpha sinensis* mitochondrial genome**

| a | c | All | J | N | a | c | All | J | N |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| F | UUU | 278.0(1.54) | 108.0(1.23) | 170.0(1.84) | Y | UAU | 140.0(1.61) | 56.0(1.40) | 84.0(1.79) |
| | UUC | 83.0(0.46) | 68.0(0.77) | 15.0(0.16) | | UAC | 34.0(0.39) | 24.0(0.60) | 10.0(0.21) |
| L | UUA | 337.0(3.88) | 186.0(4.07) | 151.0(3.67) | * | UAA | 0.0(0.00) | 0.0(0.00) | 0.0(0.00) |
| | UUG | 63.0(0.73) | 5.0(0.11) | 58.0(1.41) | | UAG | 0.0(0.00) | 0.0(0.00) | 0.0(0.00) |
| L | CUU | 53.0(0.61) | 26.0(0.57) | 27.0(0.66) | H | CAU | 49.0(1.46) | 34.0(1.33) | 15.0(1.88) |
| | CUC | 7.0(0.08) | 3.0(0.07) | 4.0(0.10) | | CAC | 18.0(0.54) | 17.0(0.67) | 1.0(0.13) |
| | CUA | 57.0(0.66) | 51.0(1.12) | 6.0(0.15) | Q | CAA | 58.0(1.78) | 47.0(1.84) | 11.0(1.57) |
| | CUG | 4.0(0.05) | 3.0(0.07) | 1.0(0.02) | | CAG | 7.0(0.22) | 4.0(0.16) | 3.0(0.43) |
| I | AUU | 323.0(1.66) | 203.0(1.57) | 120.0(1.85) | N | AAU | 137.0(1.55) | 85.0(1.37) | 52.0(1.96) |
| | AUC | 66.0(0.34) | 56.0(0.43) | 10.0(0.15) | | AAC | 40.0(0.45) | 39.0(0.63) | 1.0(0.04) |
| M | AUA | 229.0(1.70) | 188.0(1.87) | 41.0(1.19) | K | AAA | 84.0(1.71) | 73.0(1.90) | 11.0(1.05) |
| | AUG | 41.0(0.30) | 13.0(0.13) | 28.0(0.81) | | AAG | 14.0(0.29) | 4.0(0.10) | 10.0(0.95) |
| V | GUU | 97.0(2.11) | 28.0(1.17) | 69.0(3.14) | D | GAU | 68.0(1.84) | 39.0(1.77) | 29.0(1.93) |
| | GUC | 7.0(0.15) | 7.0(0.29) | 0.0(0.00) | | GAC | 6.0(0.16) | 5.0(0.23) | 1.0(0.07) |
| | GUA | 70.0(1.52) | 54.0(2.25) | 16.0(0.73) | E | GAA | 65.0(1.69) | 50.0(1.89) | 15.0(1.25) |
| | GUG | 10.0(0.22) | 7.0(0.29) | 3.0(0.14) | | GAG | 12.0(0.31) | 3.0(0.11) | 9.0(0.75) |
| S | UCU | 111.0(2.42) | 23.0(0.91) | 88.0(4.27) | C | UGU | 43.0(1.87) | 11.0(1.83) | 32.0(1.88) |
| | UCC | 6.0(0.13) | 4.0(0.16) | 2.0(0.10) | | UGC | 3.0(0.13) | 1.0(0.17) | 2.0(0.12) |
| | UCA | 120.0(2.62) | 104.0(4.12) | 16.0(0.78) | W | UGA | 81.0(1.64) | 63.0(1.85) | 18.0(1.16) |
| | UCG | 6.0(0.13) | 5.0(0.20) | 1.0(0.05) | | UGG | 18.0(0.36) | 5.0(0.15) | 13.0(0.84) |
| S | AGU | 27.0(0.59) | 9.0(0.36) | 18.0(0.87) | R | CGU | 20.0(1.45) | 6.0(0.73) | 14.0(2.55) |
| | AGC | 3.0(0.07) | 2.0(0.08) | 1.0(0.05) | | CGC | 0.0(0.00) | 0.0(0.00) | 0.0(0.00) |
| | AGA | 87.0(1.90) | 54.0(2.14) | 33.0(1.60) | | CGA | 29.0(2.11) | 24.0(2.91) | 5.0(0.91) |
| | AGG | 7.0(0.15) | 1.0(0.04) | 6.0(0.29) | | CGG | 6.0(0.44) | 3.0(0.36) | 3.0(0.55) |
| T | ACU | 54.0(1.10) | 29.0(0.72) | 25.0(2.86) | P | CCU | 64.0(1.97) | 36.0(1.53) | 28.0(3.11) |
| | ACC | 12.0(0.24) | 11.0(0.27) | 1.0(0.11) | | CCC | 10.0(0.31) | 8.0(0.34) | 2.0(0.22) |
| | ACA | 123.0(2.51) | 114.0(2.83) | 9.0(1.03) | | CCA | 48.0(1.48) | 43.0(1.83) | 5.0(0.56) |
| | ACG | 7.0(0.14) | 7.0(0.17) | 0.0(0.00) | | CCG | 8.0(0.25) | 7.0(0.30) | 1.0(0.11) |
| A | GCU | 66.0(1.78) | 30.0(1.15) | 36.0(3.27) | G | GGU | 86.0(1.60) | 32.0(1.02) | 54.0(2.43) |
| | GCC | 13.0(0.35) | 11.0(0.42) | 2.0(0.18) | | GGC | 4.0(0.07) | 1.0(0.03) | 3.0(0.13) |
| | GCA | 66.0(1.78) | 61.0(2.35) | 5.0(0.45) | | GGA | 87.0(1.62) | 72.0(2.29) | 15.0(0.67) |
| | GCG | 3.0(0.08) | 2.0(0.08) | 1.0(0.09) | | GGG | 38.0(0.71) | 21.0(0.67) | 17.0(0.76) |

a：氨基酸；c：编码相应氨基酸的密码子； All：所有蛋白质；J：J 链编码的蛋白质；N：N 链编码的蛋白质；*：终止密码。

a: Amino Acid; c: Codon; All: 13PCGs; J: PCGs encoded by H strand; N: PCGs encoded by L strand; *: Stop codon.

中总共有 4 个茎环结构，与报道的另二种昆虫接近（Buckley et al, 2000; Misof et al, 2003），而在蜜蜂相应位置有 3 个茎环结构，在蠡斯中此处只有 2 个茎环结构。

与 *R. dubia* 相比 srRNA 有 2 处存在局部变异（a、b）（图 4B）。a 位于结构域 I，包含 2 个额外的茎环结构（H-1 和 H-2）；b 位于结构域III，缺少一个茎环结构，此结果与蜜蜂的相似（Gillespie et al, 2006）。

### 3.4 A+T 丰富区

在短额负蝗的 A+T 丰富区发现的 Poly（T）在直翅目及双翅目中普遍存在的，也许是复制及转录的起始位置（Zhang et al, 1995；Cha et al, 2007）。Saito et al（2005）在 *Locusta migratoria*，*Schistocerca gregaria* 和 *Centropomus parallelus* 的相应位置也发现图 5 所示的类似茎环结构，并推测此结构与复制及转录起始密切相关。

**参考文献**:


Ballard JWO. 2000. Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup [J]. *J Mol Evol*, **51**: 48-63.

Beard CB, Hamm DM, Collins FH. 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*, DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects [J]. *Insect Mol Biol*, **2**(2): 103-124.

Bonfield JK, Smith KF, Staden R. 1995. A new DNA sequence assembly program [J]. *Nucleic Acids Res*, **24**: 4992-4999.

Buckley TR, Simon C, Flookand PK, Misof B. 2000. Secondary structure and conserved motifs of the frequently sequenced domains IV and V of the insect mitochondrial large subunit rRNA gene [J]. *Insect Mol Biol*, **9** (6): 565-580.

Cameron SL, Miller K, D'Haese CA, Whiting MF, Barker SC. 2004. Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea *sensu lato* (Arthropoda)[J]. *Cladistics*, **20**: 534-557.

Cha SY, Yoon HJ, Lee EM, Yoon MH, Hwang JS, Jin BR, Han YS, Kim I. 2007. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae)[J]. *Gene*, **392**: 206-220.

Flook PK, Rowell CH, Gellissen G. 1995. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome [J]. *J Mol Evol*, **41**: 928-941.

Francino MP, Ochman H, 1997. Strand asymmetries in DNA evolution [J]. *Trends Genet*, **13**(6): 240-245.

Gillespie JJ, Johnston JS, Cannone JJ, Gutell RR. 2006. Characteristics of the nuclear (18*S*, 5.8*S*, 28*S* and 5*S*) and mitochondrial(12*S* and 16*S*) rRNA genes of *Apis mellifera*(Insect: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements [J]. *Insect Mol Biol*, **15**: 657– 686.

Goddard JM, Wolstenholme DR. 1980. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from the genus Drosophila[J]. *Nucleic Acids Res*, **8**(4): 741-757.

Kim I, Cha SY, Yoon MH, Hwang JS, Lee SM, Sohn HD, Jin BR. 2005. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the oriental mole cricket, *Gryllotalpa orientalis* (Orthoptera: Gryllotalpidae)[J]. *Gene*, **353**: 155-168.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Brief Bioinform*, **5** : 150-163.

Krzywinski J, Wilkerson NJ, 2003. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations[J]. *Annu Rev Entomol*, **48**: 111-139.

Liu N, Hu J, Huang Y. 2006. Amplification of grasshoppers complete mitochondrial genomes using long PCR[J]. *Chin J Zool*, **41**: 61-65.[刘念，胡 靖，黄 原. 2006. 应用长 PCR 扩增蝗虫线粒体全基因组. 动物学杂志, **41**：61-65.]

Lowe TM, Eddy, SR. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomeic sequence[J]. *Nucleic Acids Res*, **25**: 955-964.

Misof B, Fleck G. 2003. Comparative analysis of mt LSU rRNA secondary structures of Odonates: structural variability and phylogenetic signal [J]. *Insect Mol Biol*, **12** (6): 535-547.

Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F. 2003. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations[J]. *Insect Mol Biol*, **12**: 605-611.

Reyes A, Gissi C, Pesole G, Saccone C. 1998. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals[J]. *Mol Biol Evol*, **15**( 8): 957-966.

Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G, Reyes A. 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system[J]. *Gene*, **238**(1): 195-209.

Saito S, Tamura K, Aotsuka T. 2005. Replication origin of mitochondrial DNA in insects[J]. *Genetics*, **171**: 1695-1705.

Shadel GS, Clayton DA, 1993. Mitochondrial transcription initiation: variation and conservation[J]. *J Biol Chem*, **268**: 16083-16086.

Simon C, Frati F, Bekenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Ann Entomol Soc Am*, **87**: 651-701.

Simon C, Buckley TR, Frati F, Stewart JB, Beckenbach AT. 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA [J]. *Ann Rev Ecol Evol Syst*, **37**: 545-579.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, **25**: 4876-4882.

Wilson K, Cahill V, Ballment E, Benzie J. 2000. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus mondon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? [J]. *J Mol Evol*, **17**: 863-874.

Wolstenholme DR, 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution[J]. *Int Rev Cyt*, **141**: 173−216.

Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM. 1995. Evolution and structure conservation of the contral region of insect mitochondrial DNA [J]. *J Mol Evol*, **40**: 382-391.

Zhou ZJ, Huang Y, Shi FM. 2007. The mitochondrial genome of the *Ruspolia dubia* (Orthoptera: Conocephalidae): a short A+T-rich region with 70bp in length [J]. *Genome*, **50**(9): 855-866.